Ein selbständig registrierendes, volumetrisches Mikrorespirometer*

Von HELMUT PRUSCHA, FRIEDRICH FEHRINGER und RUDOLF KREN

Mit 2 Abbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung der mathem.-naturw. Klasse am 16. Dezember 1983 durch das w. M. WILHELM KÜHNELT)

Einleitung

Der Anlaß zu Planung und Herstellung der hier beschriebenen Respirometer waren Sauerstoffverbrauchsmessungen an kleinen Insekten über längere Zeitspannen, daraus ergaben sich folgende Voraussetzungen: Im Vordergrund stand der Wunsch nach einer selbständigen Registrierung mit möglichst einfacher Bedienung und Robustheit im Betrieb. Darunter durfte weder die Empfindlichkeit noch die Genauigkeit leiden. Ferner bestand noch das Bestreben, möglichst variabel zu bleiben, um den verschiedenartigen Versuchsbedingungen und Versuchstieren durch entsprechende Anpassung gerecht zu werden.

Fast alle Respirometer, bei denen bisher eine Automatisierung erzielt wurde, basieren auf dem Prinzip der Elektrolyse (MACFADYEN, 1961, PHILLIPSON, 1962, CHASE, UNWIN and BROWN, 1968, KLEKOWSKI and ZAJDEL, 1972, TURNER and STEVENSON, 1974, ANNIS and NICOL, 1975 und viele andere). Bei diesen führt jedoch die Zu- und Abschaltung des Elektrolysestroms mit Hilfe eintauchender Elektroden fast immer zu größeren Fehlern, erst GUTMANN (1983) nimmt eine kontaktlose Schaltung mit einer Lichtschranke am Manometer vor. Allen diesen elektrolytischen Respirometern steht nur eine sehr kleine Zahl volumetrischer gegenüber, wie zum Beispiel das von TUFT (1950).

Da sich die Herstellung möglichst einfach gestalten sollte, griffen wir auf das bereits oftmals erfolgreich bewährte Prinzip von SCHOLANDER zurück (SCHOLANDER, 1950; SCHOLANDER, CLAFF, ANDREWS and WALLACH, 1952; SCHOLANDER and IVERSEN, 1958), das modifiziert von NOPP (1965) und WATZBAUER und FEHRINGER (1982) verwendet wurde. Auf die von KRATOCHVIL (1974) mit einer Registriereinrichtung versehenen Respirometer aufbauend, konnten weitgehende Verbesserungen erreicht werden.

Konstruktion des Respirometers

Das Respirometer (Abb. 1) besteht im wesentlichen aus vier Bauelementen, die auf einer Grundplatte aus 15 mm starkem Plexiglas montiert sind. Der zentrale Teil ist der Manometerblock (A), der aus einem ebenfalls 15 mm starken Plexiglasblock durch Ausbohren und -fräsen der entsprechenden Teile in seine endgültige Form gebracht

* Mit Unterstützung durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich, Projekt-Nummer 2953.

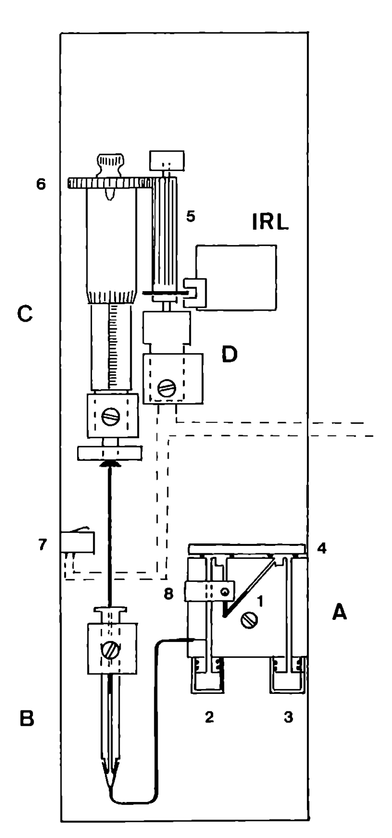


Abb. 1: Frontansicht des Respirometers. Abkürzungen: A = Manometerblock, B = Mikrolitersspritze, C = Mikrometerschraube, D = Motor mit Getriebe, IRL = Infrarot-Lichtschranke, 1 = Manometer, 2 = Respirationsgefäß, 3 = Kompensationsgefäß, 4 = Manometerverschluß, 5 = Kunststoffritzel, 6 = Zahnrad, 7 = Endschalter.

wurde, um jede Klebestelle und damit möglicherweise undichte Stelle zu vermeiden. An das relativ dünne Manometer (1) mit 2 mm Durchmesser, schließt sich beiderseits ein Näpfchen an, das zum Auffangen eventuell überfließender Manometerflüssigkeit dient. Das als Sperrflüssigkeit oftmals bewährte Petroleum wurde entgegen den normalen Gewohnheiten nicht mit fettlöslichen Farbstoffen versehen. Zwei Längsbohrungen mit etwas größerem Durchmesser führen zu dem Respirations- und dem Kompensationsgefäß (2 und 3), die zwecks besserer Abdichtung auf Stutzen mit je zwei „O"-Ringen angesetzt sind. Gleichfalls durch „O"-Ringe wird auch der Manometerverschlußbügel (4) gedichtet.

Der Ausgleich des in der Respirationskammer verbrauchten Sauerstoffes wird durch Nachschieben von reinem Sauerstoff aus einer gasdichten Hamilton-Mikrolitersspritze erreicht (B). Die eingangs geforderte Variabilität bei geänderten Bedingungen wird durch die leichte

Tauschbarkeit der Spritzen erreicht, die bei einem Volumen von 10 bis 1000 µl infolge ihres gleichbleibenden Außendurchmessers leicht wechselbar in einer Kunststoffklemmvorrichtung befestigt sind. Von der Spritze, an der der Sauerstoffverbrauch direkt in µl ablesbar ist, führt eine Teflonkanüle, abermals abgedichtet mit einem kleinen „O"-Ring, zur Respirationskammer. Die senkrecht über der Spritze angebrachte, 50 mm lange Einbaumikrometerschraube (C) bewirkt den Vorschub des Spritzenstempels, mit dem sie aber nicht fix verbunden ist. Dadurch müssen die Längsachsen der beiden Bauteile nicht so exakt übereinstimmen, und es bleibt die leichte Tauschbarkeit erhalten. In dieser Konstellation kann das Respirometer, wie jedes andere auch, händisch bedient werden.

Wie aus der Abbildung 1 ersichtlich, erfolgt hier der Antrieb durch einen Motor mit angeflanschtem Getriebe (D), auf dessen Achse ein 50 mm langes Kunststoffritzel (5) befestigt ist. Dieses Ritzel wiederum greift in ein großes Zahnrad (6) ein, das leicht lösbar mit einer Rändelschraube auf die Meßtrommel des Mikrometers geschraubt ist. Bei Erreichen des maximalen Mikrometervorschubes schaltet ein Endabschalter (7) den Motorstrom ab, um Schäden am Antrieb zu verhindern.

Regelung und Steuerung

Wenn ein Tier in der Respirationskammer Sauerstoff verbraucht, steigt die Manometerflüssigkeit in dem näher gelegenen Schenkel des Manometers an. Dieser Vorgang wird von einer Lichtschranke (8) überwacht, die aus einer kleinen Glühbirne und einem Phototransistor gebildet wird. Durch die Anordnung auf einem verschiebbaren Neusilberbügel bleibt die Lichtschranke in geringem Umfang justierbar. Bereits geringfügige Niveauveränderungen der Manometerflüssigkeit genügen, damit von der Lichtschranke über ein Relais der Antriebsmotor in Gang gesetzt und so von der Mikrometerschraube Sauerstoff aus der Spritze in die Respirationskammer gedrückt wird. Das führt zu einer Absenkung der Manometerflüssigkeit und weiters zur Abschaltung des Motorstromes.

Bei der Ansteuerung des Motors war zu beachten, daß ungefärbtes Petroleum wesentlich mehr Licht durch das Manometer durchläßt als eine mit Luft gefüllte und dadurch stark lichtbrechende Bohrung. Jedes durch Sauerstoffverbrauch verursachte Hochziehen der Manometerflüssigkeit vor die Lichtschranke erhöht also die Lichtausbeute der Lichtschranke, weshalb der Motor bei größerer Helligkeit ein- und bei Verdunkelung wieder abgeschaltet wird (siehe auch Tuft, 1950).

Registrierung

Für den automatischen Betrieb dieser Respirometer sind zwei getrennte Registriereinrichtungen vorgesehen, deren Funktionsschema aus Abbildung 2 ersichtlich ist. Die erste dient der schnellen Übersicht und Funktionsprüfung, sie ist mit den Motoren direkt gekoppelt. Es

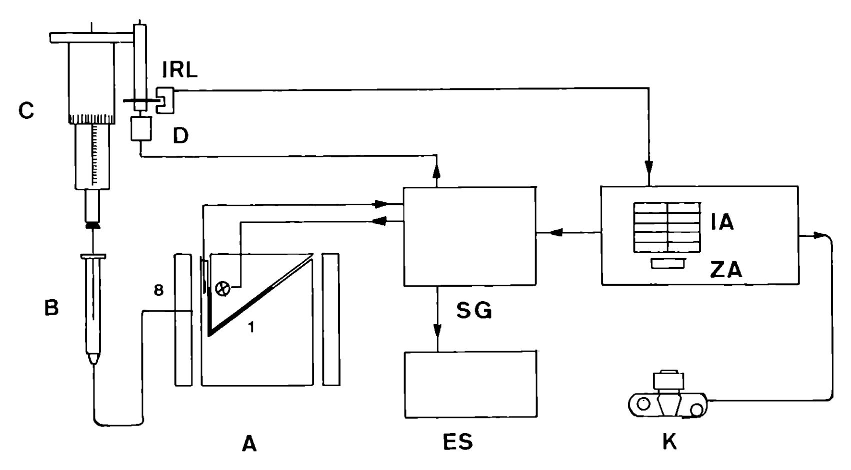


Abb. 2: Funktionsschema. Abkürzungen: A = Manometerblock, B = Mikroliterspritze, C = Mikrometerschraube, D = Motor, ES = Ereignisschreiber, IA = Impulsanzeige, IRL = Infrarot-Lichtschranke, K = Kamera, SG = Steuergerät, ZA = Zeitanzeige, 1 = Manometer, 8 = Lichtschranke.

handelt sich dabei um einen Vielfach-Ereignisschreiber (ES), dessen Schreibwerke angesteuert werden, solange ein Motor eines Respirometers eingeschaltet ist. Man kann daher aus der Dauer der Einschaltzeit auf das Volumen des verbrauchten Sauerstoffes zurückrechnen (KRATOCHVIL, 1974). Neben den absoluten Verbrauchswerten bekommt man aber auch die Häufigkeitsverteilung der Einschaltungen, was besonders für die Überprüfung zirkadianer Rhythmen und stark diskontinuierlicher Atmung von Wichtigkeit ist.

Die zweite Möglichkeit ist aufwendiger, aber gleichzeitig auch genauer. Auf dem vom Motor angetriebenen Ritzel ist eine kupferkaschierte Scheibe aufgepreßt, die am Rand mit Schlitzen versehen ist, welche von einer Infrarot-Lichtschranke (IRL) abgetastet werden. Sobald sich die Scheibe dreht, wird jedes Freigeben des Lichtstrahles als Impuls gewertet. 100 Impulse entsprechen dabei dem Vorschub der Mikrometerschraube um 1 mm. Für jedes einzelne Respirometer erfolgt die Aufsummierung der so entstandenen Impulse getrennt, genauso wie auch deren Anzeige mit Leuchtziffern (IA). Neben den Impulszählern ist auch eine Uhr untergebracht, die über einen manuell betätigten Intervallschalter den Verschluß und Filmtransport einer 24 × 36 mm Spiegelreflexkamera (K) steuert. Damit kann frei wählbar in Abständen von 1 bis 999 Minuten von der Anzeige aller zehn Respirometer eine Aufnahme gemacht werden, auf der – je nach Einstellung – die Uhrzeit oder aber die Dauer des Experimentes gleichfalls festgehalten ist. Während jeder Belichtung unterbricht ein Relais die Stromanspeisung aller Motoren und verhindert damit die Entstehung weiterer Zählimpulse. Es bleibt daher auch bei längeren Belichtungszeiten der Kamera die Anzeige bis zu einer Sekunde stabil.

Die erzielte Genauigkeit liegt bei maximal 0,002 μl. Dieser Wert gilt sowohl für die automatische Registrierung als auch für eine manuelle Bedienung der Respirometer. Damit wird es möglich, den Sauerstoffverbrauch einzelner, sehr kleiner Insekten mit ungefähr 1–10 mg Körpergewicht zu messen.

Literatur

ANNIS, P. C., NICOL, G. R.: Respirometry system for small biological samples. J. Appl. Ecol. 12 (1975), 137–142.

CHASE, A. M., UNWIN, D. M., BROWN, R. H. J.: A simple electrolytic respirometer for the continuous recording of oxygen consumption under constant and natural conditions. J. Exp. Biol. 48 (1968), 207–215.

DAVIES, P. S.: A constant pressure respirometer for medium sized animals. Oikos 17 (1966), 108–112.

GUTMANN, K.: Measuring oxygen consumption with an all-electronic multi-range digital respirometer. Oecologia (Berlin) 56 (1983), 140.

KLEKOWSKI, R. Z., ZAJDEL, J. W.: Capacity electrolytic respirometer KZ-CER-01T with review and discussion of electrolytic respirometry. Pol. Arch. Hydrobiol. 19 (1972), 475–504.

KRATOCHVIL, H.: Ein selbständig registrierendes Respirometer. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Abt. I, 182 (1974), 259–263.

MACFADYEN, A.: A new system for continuous respirometry of small air breathing invertebrates in near natural conditions. J. Exp. Biol. 38 (1961), 323–341.

NOPP, H.: Temperaturbezogene Regulation des Sauerstoffverbrauches und der Herzschlagrate bei einigen Landpulmonaten. Z. vergl. Physiol. 50 (1965), 641–659.

PHILLIPSON, J.: Respirometry and the energy turnover in natural systems with particular reference to harvest spiders (Phalangiidae). Oikos 13 (1962), 311–322.

SCHOLANDER, P. F.: Volumetric plastic respirometer. Rev. Sci. Instrum. 21 (1950), 378–380.

SCHOLANDER, P. F., CLAFF, C. L., ANDREWS, J. R., WALLACH, D. F.: Microvolumetric respirometry. J. gen. Physiol. 35 (1952), 375–395.

SCHOLANDER, P. F., IVERSEN, O.: New design of volumetric respirometer. Scand. J. clin. Lab. Invest. 10 (1958), 429–431.

TUFT, P.: A new micro-respirometer with automatic setting and recording apparatus. J. Exp. Biol. 27 (1950), 334–349.

TURNER, B. D., STEVENSON, R. A.: An electrolytic, digital recording, multichannel micro respirometer. J. Exp. Biol. 61 (1974), 321–330.

WAITZBAUER, W., FEHRINGER, F.: Ein modifiziertes Scholander-Respirometer. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Abt. I, 191 (1982), 143–148.

Adresse: Dr. Helmut Pruscha, Institut für Zoologie der Universität Wien, Althanstraße 14, A-1090 Wien